

18/5/3
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010677611

WPI Acc No: 1996-174566/199618

XRAM Acc No: C96-055000

Human serum albumin gene modified by introduction of restriction site -
useful for production of fusion proteins by inserting active peptide
coding sequence into new restriction site

Patent Assignee: ASAHI GLASS CO LTD (ASAG)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 8051982	A	19960227	JP 94209369	A	19940811	199618 B

Priority Applications (No Type Date): JP 94209369 A 19940811

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 8051982	A	19	C12N-015/09		

Abstract (Basic): JP 8051982 A

A modified gene coding for human serum albumin (HSA), prepared by introducing restriction enzyme cleavage site(s) into at least one arbitrary position of a gene encoding wild-type HSA, is new. Also claimed are: (1) a fusion protein prepared by introducing gene(s) coding for physiologically active peptide(s) into the restriction enzyme cleavage site(s) of the modified gene; and (2) a gene encoding the fusion protein.

USE - Physiologically active fusion proteins can be produced by inserting their coding sequences into the restriction sites newly introduced into the HSA gene.

ADVANTAGE - The use of the modified HSA gene permits any form of physiologically active peptide to be readily introduced by genetic engineering into a specific site in human serum albumin, thus enabling the easy preparation of a novel physiologically active fusion protein.

Dwg.0/8

Title Terms: HUMAN; SERUM; ALBUMIN; GENE; MODIFIED; INTRODUCING; RESTRICT; SITE; USEFUL; PRODUCE; FUSE; PROTEIN; INSERT; ACTIVE; PEPTIDE; CODE; SEQUENCE; NEW; RESTRICT; SITE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): C07K-019/00; C12N-001/19;
C12P-021/02; C12R-001-645

File Segment: CPI

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-51982

(43) 公開日 平成8年(1996)2月27日

(51) Int.Cl. ⁶ C 12 N 15/09 C 07 K 19/00 // C 12 N 1/19 C 12 P 21/02	識別記号 ZNA	府内整理番号 8318-4H 8828-4B 9282-4B 9281-4B	F I	技術表示箇所 C 12 N 15/00 ZNA A 審査請求 未請求 請求項の数13 FD (全19頁) 最終頁に続く
---	-------------	--	-----	--

(21) 出願番号 特願平6-209369

(22) 出願日 平成6年(1994)8月11日

(71) 出願人 000000044
旭硝子株式会社
東京都千代田区丸の内2丁目1番2号

(72) 発明者 東田 英毅
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内

(72) 発明者 村上 喜美子
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内

(72) 発明者 浜 純子
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内

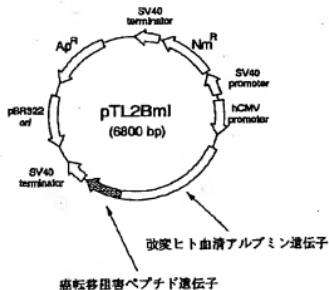
(74) 代理人 弁理士 長谷川 洋子 (外2名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト血清アルブミンをコードする改変された遺伝子

(57) 【要約】

【目的】 生理活性を有するペプチドと、キャリアとしてのヒト血清アルブミンとを遺伝子工学的に結合して融合タンパク質を製造する際に、該ペプチドとの結合をしやすく改変した、改変ヒト血清アルブミン遺伝子を提供する。

【構成】 天然型のヒト血清アルブミンをコードし、少なくとも1つ以上の所望の位置に、特にはヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、カルボキシル末端、第1～2ドメイン間あるいは第2～3ドメイン間に、制限酵素切断部位を導入してなる、ヒト血清アルブミンをコードする改変された遺伝子、並びに、該遺伝子を用いて遺伝子組換え手法によって製造された生理活性を有する融合タンパク質。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 天然型のヒト血清アルブミンをコードする遺伝子の少なくとも1つ以上の所望の位置に制限酵素切断部位を導入してなる、ヒト血清アルブミンをコードする改変された遺伝子。

【請求項2】 制限酵素切断部位の導入位置が、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、カルボキシル末端、第1～2ドメイン間あるいは第2～3ドメイン間のうちのいずれか1箇所若しくはこれら2つの任意の組み合わせの位置である、請求項1に記載の遺伝子。

【請求項3】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端である、配列番号1の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項4】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の第1～2ドメイン間である、配列番号2の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項5】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の第2～3ドメイン間である、配列番号3の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項6】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のカルボキシル末端である、配列番号4の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項7】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、第1～2ドメイン間、第2～3ドメイン間およびカルボキシル末端である、配列番号5の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかに記載の遺伝子の制限酵素切断部位に生理活性を有するペプチドをコードする遺伝子を導入することによって作製した融合タンパク質。

【請求項9】 請求項8に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項10】 生理活性を有するペプチドが配列番号6のアミノ酸で表される、請求項8に記載の融合タンパク質。

【請求項11】 生理活性を有するペプチドをコードする遺伝子が、配列番号7の塩基配列で表される、請求項9に記載の遺伝子。

【請求項12】 配列番号8のアミノ酸配列で表される、請求項8に記載の融合タンパク質。

【請求項13】 配列番号9の塩基配列で表される、請求項12に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、遺伝子組換え技術によ

る新規融合タンパク質を作製する際に最適な、改変ヒト血清アルブミン遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】 生理活性を有するペプチドを医薬品などの目的で使用する際、そのペプチドのみを単独で投与した場合、目的とする生理活性を十分に示さないことがしばしば起こる。これは主に分解酵素による不安定化や臓器への吸着が原因である。この問題を解決するために、通常、生理活性ペプチドと生体高分子との融合体を作製し、その融合体を投与する方法が取られている。用いることのできる生体高分子の例は数多くあるが、体内、特に血中に多量に存在するため副作用が最も少ないと予想される、血清アルブミンを用いることが好適に用いられる。

【0003】 生理活性ペプチドと血清アルブミンの融合体を作製するには、化学的に結合する方法が常法とされている。例えば、癌転移阻害活性を有することが確認されているペプチドである11F-2（特開平3-3499号公報、Isoai et al., Jpn. J. Cancer Res., 81, 909-914 (1992) およびIsoai et al., Cancer Res., 52, 1422-1426 (1992)）を用いる場合、該ペプチドと血清アルブミンを水溶性カルボジイミドで結合させて新規融合タンパク質を作製し、使用することによって、単独の該ペプチドと比較してより強い癌細胞浸潤阻害活性並びに癌転移抑制活性を示すことが本願発明者らにより確認されている（特開平4-254000号、同4-30099号、同4-30099号、同4-30099号公報およびBiochem. Biophys. Res. Commun., 192, 7-14 (1993)）。すなわち、該ペプチドを単独で用いる場合に比べ、1/50～1/60の低濃度で、ヒトおよびマウス由来高転移性癌細胞の細胞外基底膜への浸潤を強く抑制した。さらに、癌細胞をマウスの尾静脈より注入し肺や肝臓などの主要臓器に転移させるいわゆる「実験的転移モデル」系において、該ペプチドと血清アルブミンによる新規融合タンパク質は、該ペプチド単独で用いる場合に比べ、1/10以下の低用量で同等以上の転移阻害活性を示した。

【0004】 上記の癌転移阻害ペプチドと血清アルブミンの融合体の場合のように、融合タンパク質を構成する生理活性ペプチドと生体高分子の両者が、どちらもタンパク質性アミノ酸の直鎖状結合によって構成される場合、遺伝子工学的目的融合タンパク質が作製可能であることは、容易に推測できる。すなわち目的とする融合タンパク質をコードする遺伝子を作製し、大腸菌や酵母を宿主とする異種タンパク質生産システムに導入して作製すればよい。遺伝子工学的に作製することによって、化学的に結合する方法では作製することのできない融合タンパク質の作製が可能である。例えば、生体高分子の特定の位置に生理活性ペプチドを導入することや、融合タンパク質中の生理活性ペプチドと生体高分子の個数の比を制御することが容易になる。

【0005】したがって、遺伝子操作技術を用いて生理活性ペプチドを結合させる際に、キャリアとして用いる生体高分子を、いかに目的の生理活性ペプチドを組みやすいものを選択するか、あるいはいかに組込みやすく改変するかが問題であった。それと同時に、どのようなタイプの生理活性ペプチドでも結合できるような構造を持つていることが必要である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明はかかる事情に鑑みてなされたもので、融合タンパク質を作製するキャリアとして最適な血清アルブミン遺伝子を提供するものである。そして、これを用いて遺伝子組換え技術により効率的かつ大量に融合タンパク質を生産せしめることが可能となる。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決するために観察研究を重ね、生理活性ペプチドを容易に組むことができるヒト血清アルブミン遺伝子を考案設計し、遺伝子組換え技術を用いて作製とともに、実際に生理活性ペプチドと結合させた新規融合タンパク質を作製することによって、この融合タンパク質が目的とする生理活性を示すことを確認した。

【0008】すなわち本発明によれば、天然型のヒト血清アルブミンをコードする遺伝子の少なくとも1つ以上の所望の位置に制限酵素切削部位を導入してなる、ヒト血清アルブミンをコードする改変された遺伝子が提供される。

【0009】ここで、前記制限酵素切削部位の導入位置が、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、カルボキシル末端、第1～2ドメイン間あるいは第2～3ドメイン間のうちのいずれか1箇所若しくはこれらの任意の組み合わせの位置であるのが好ましい。

【0010】また本発明によれば、上記いずれかの遺伝子の制限酵素切削部位に生理活性を有するペプチドをコードする遺伝子を導入することによって作製した融合タンパク質が提供される。

【0011】さらに本発明によれば、上記融合タンパク質をコードする遺伝子が提供される。

【0012】以下、本発明について詳述する。

【0013】本発明の改変ヒト血清アルブミン遺伝子は、生理活性を有するペプチドとの結合を容易ならしめるために、天然型のヒト血清アルブミンをコードする遺伝子に新たに制限酵素切削部位を導入して作製される。

【0014】改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製のために用いる天然のヒト血清アルブミン遺伝子は、例えば、ヒト肝臓cDNAライブラリーよりプラスミドpILMALB5(国立予防衛生研究所遺伝子バンク)の制限酵素PvuII-HindIII断片をプローブとしてクローニングすること等により得ることができる。なお、ヒト血清アルブミン遺伝子には、そのアミノ酸配列

が互いに若干異なっているという多型が報告されており、上記の方法でクローニングしたヒト血清アルブミン遺伝子もその範囲に入るるものである。本発明における「ヒト血清アルブミン」とは、これらすべての多型のものを含み得る。

【0015】次に、このヒト血清アルブミン遺伝子の所定位置に制限酵素切削部位をもつ断片を導入し、改変ヒト血清アルブミン遺伝子を作製する。この制限酵素切削部位の導入は、後に生理活性を有するペプチド遺伝子(例えば、癌転移阻害遺伝子など)の結合を容易ならしめるためのもので、癌転移阻害遺伝子結合の際にこの部位を制限酵素にて切削し、この切削部に癌転移阻害遺伝子を結合させるためである。

【0016】改変の対象である制限酵素切削部位を導入する位置は、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖中に任意の位置に設定することができるが、活性を十分に発揮せることを考慮すると、タンパク質の表面に位置しており、かつ立体構造を破壊することのない位置であることが好ましい。例えば、アミノ末端(N末端)あるいはカルボキシル末端(C末端)など、ヒト血清アルブミンの立体構造の形成に影響を及ぼさないと考えられる位置が望ましい。また、ヒト血清アルブミンの立体構造は、X線結晶解析によって詳細に検討されており(Xia, M.H., and Carter, D.C. Nature, 358:209-215, 1992)、3個あるドメインの間の、すなわち第1～2ドメイン間あるいは第2～3ドメイン間も、導入部位の候補となり得る。導入する制限酵素切削部位の個数は、必要に応じて、単一の位置、ないしは複数の位置に、単数あるいは複数個導入し得る。

【0017】導入する制限酵素切削部位は、既知の制限酵素によって認識されるものであればよい。望ましくは、ヒト血清アルブミン中にほとんど存在しない切削部位であり、かつ切削酵素が容易に入手できるものが望ましい。特に6塩基認識でかつ消化後に粘着末端を形成するものがライゲーションを行いうえで好ましい。また、当然に天然のアミノ酸配列を一切変更しないことと同時に、塩基配列もできるだけ変更しないことが望ましい。以上の点を鑑みて、アミノ末端およびカルボキシル末端に制限酵素Afl I I I I 切削部位を、第1～2ドメイン間に制限酵素Hind I I I I 切削部位を、第2～3ドメイン間に制限酵素Eco RI 切削部位を導入するのが最も好ましい。なお、制限酵素切削部位導入法としては任意の方法を用い得るが、当業分野で常用されているPCRを用いた変異導入法等が好適に用いられる。

【0018】さらに本発明では、生理活性を有するペプチドをコードする遺伝子を作製し、これを上記改変ヒト血清アルブミン遺伝子の制限酵素切削部位に結合させて、生理活性を有する融合タンパク質遺伝子を作製する。次いで、この遺伝子を発現ベクターに導入し、さらにつれてこのベクターを用いて宿主細胞で該遺伝子を発現さ

せ、宿主細胞内より抽出、精製することによって、生理活性融合タンパク質を製造する。

【0019】この生理活性を有するペプチドとしては、例えば、配列番号6のアミノ酸配列で表される癌転移阻害活性を有するペプチド(癌転移阻害ペプチド；特開平3-34993号公報)等が挙げられる。この癌転移阻害ペプチドをコードする遺伝子としては理論的には幾通りもの数多くの配列が考えられるが、望ましくは遺伝子組換えに用いる宿主細胞のコドン使用頻度に合わせたものがよく、最も多頻度で使用されるコドンを用いて設計するのがよい。

【0020】ここで、用いる宿主細胞としては特に限定されるものではないが、望ましくは培養方法が容易で、低コストで培養できる微生物がよく、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、各種酵母類、枯草菌、糸状菌等、当業分野で常用されている宿主細胞等が挙げられる。原核生物を宿主細胞として用いる形質転換方法では必ずしも全てのポリペプチドに対して有効ではなく、真核生物由來のタンパク質の複雑な翻訳後修飾あるいは天然体と同じ立体構造を再現することは必ずしも容易ではない。また特有のエンドトキシンが存在する場合は、最終製品の杂质になる可能性があり、好ましくない。このため望ましくは、エンドトキシンを含まず、培養方法も確立しており、從来より脱酰並びに食品工業で用いられており、人体に関する安全性も確立されている各種酵母類がよい。このなかでも特に、遺伝学的並びに分子生物学的に動物細胞に近い性質をもつとされ、より天然体に近い遺伝子産物が得られることが期待される分裂酵母シオサッカロミセス・ボンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)が最も好ましい。このシオサッカロミセス・ボンベの菌株としては、例えば寄託番号ATCCC 38399(len-32h)やATCCC 38436(ura4-294h⁻)等としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に寄託されているものが挙げられ、入手可能である。

【0021】したがって本発明においては、配列番号6で表される癌転移阻害ペプチドをコードする遺伝子は、シオサッカロミセス・ボンベでの高発現に至適なコドンを用いて設計し、合成したものであるのが最も好ましい。シオサッカロミセス・ボンベの最適コドン使用頻度は、例えば A. Nasim et al.: *Molecular Biology of the Fission Yeast*, p.263, Academic Press (1983)等から知ることができる。本発明者は種々研究を重ねた結果、配列番号7の塩基配列で表される遺伝子が最も好適であるとの結論を得、設計、合成した(ただし配列番号7の塩基配列は、翻訳開始シグナル(A T G)および翻訳終了シグナル(T A A)を付加している)。なお、遺伝子の作製(合成)は、トリエヌチル法(Nuc. Acid. Res. 10, p.6553, (1982))やホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, p.1859, (1981))などの種々の

方法がすでに開発されており、いずれの方法を用いてもよい。またDNA合成機器(DNAシンセサイザ)等が市販されているので、それらを用いてもよい。

【0022】次に、上記のようにして作製した新規の癌転移阻害融合タンパク質遺伝子をベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。用いるベクターは特に限定されるものではないが、宿主細胞内で自律的に複製可能であって、癌転移阻害融合タンパク質合成遺伝子(外来遺伝子)を組み込み得る挿入部位をもち、さらにこの組み込んだ合成遺伝子を宿主細胞内で発現せしめることを可能とする領域を有する必要がある。このようなベクターとして、例えば本発明者がすでに創出に成功しているシオサッカロミセス・ボンベを宿主とする外来遺伝子発現ベクター pTL2M(特願平5-249310号明細書)等を有利に用いることができ、これらのベクターに上記合成遺伝子を容易に組み込み得る。

【0023】次いで上記組換えベクターを宿主細胞内に導入し、形質転換体を得る。組換えベクターの宿主細胞内への導入法は、從来慣用的に用いられている方法により行うことができ、コンピテント細胞法、プロトプラス法、リン酸カルシウム共沈法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リボソーム融合法、バーティカル・ガン法等、種々のものが挙げられるが、用いる宿主に応じてそれぞれ任意の方法を取り得る。シオサッカロミセス・ボンベを宿主とする場合は、例えば酢酸リチウム法(K. Okazaki et al., *Nucleic Acids Res.*, 18, 6485-6489(1990))等によって効率よく形質転換体を得ることができる。

【0024】このようにして得られた形質転換体を培養することにより、培養物中に癌転移阻害融合タンパク質が产生される。これを公知の方法で単離し、場合により精製することにより、目的とする癌転移阻害融合タンパク質が得られる。

【0025】形質転換体を培養するための培地は公知であり、YPD培地などの栄養培地(M. D. Rose et al., "Methods In Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press(1990))や、MB培地などの最少培地(K. Okazaki et al., *Nucleic Acids Res.*, 18, 6485-6489(1990))等を用いることができる。形質転換体の培養は、通常16~42℃、好ましくは25~37℃で、8~168時間、好ましくは24~72時間行う。振盪培養と静置培養のいずれも可能であるが、必要に応じて搅拌や通気を加えてよい。

【0026】培養物中に产生した融合タンパク質の単離・精製法としては、公知の塩析または溶媒沈殿法等の溶解度の差を利用する方法、透析、膜外過濾またはゲル電気泳動法等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の

差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

【0027】単離・精製した融合タンパク質の確認方法としては、公知のウエスタンプロッティング法や活性測定法等が挙げられる。また、精製された融合タンパク質は、アミノ酸分析、アミノ末端分析、一次構造解析などによりその構造を明らかにことができる。

【0028】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例によりその技術範囲が限定されるものではない。また実施例中の各操作については、特に記載したもの以外は、当業界で常用されている方法（例えば J. Sambrook et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.）に従った。

【0029】【実施例1】配列番号1の変更ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりpUC19（宝酒造（株）製）上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを錠型として、配列番号1 2および1 3の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素Nco I（宝酒造（株）製）およびHind III（宝酒造（株）製）によって末端調節（部分消化）を行なった。フェノール抽出、エタノール沈殿による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約1800塩基対に相当するバンドを切り出し、DNA-PREP（旭硝子）を用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片とした。

【0030】さらにこれとは別に、シグサッカロミセス・ボンベ発現ベクターpTL2Mを用意した。このベクターpTL2Mは、本願発明者らがすでに構築したものである（特願平5-249310号明細書）。以下にその作製方法を述べる。

【0031】【ベクターpTL2Mの作製】まず、公知の方法で調製されたpCD4CATをBamHIで切断し、CAT遺伝子を除去後ライゲーションし、pCD4を作製した。pCD4をBamHIで部分切断し、平滑末端化した後ライゲーションしてpCD4Bを作製した（特開平5-15380号公報）。

【0032】このプラスミドpCD4Bを制限酵素Sac Iで消化後、末端をT4DNAポリメラーゼで平滑化し、さらに制限酵素BamHIで消化した後、フェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製した。さらにアガロースゲル電気泳動後、ガラスビーズ法によって約4500塩基対に相当するDNAを精製した。

【0033】一方、これとは別に、ヒト線維芽細胞由来の岡山一バーグcDNAライブラリー（pCDベクター）を公知の方法により調製した。さらに、既に知られているヒトリボルコルチンIの遺伝子配列（Nature, 320,

77, (1986)）のうち、タンパク質のN末端側アミノ酸配列をコードする50塩基の遺伝子配列をDNAプローブとして上述のライブラリーからリボコルチンIの遺伝子をコロニーハイブリダイゼーション法により取得し、塩基配列を決定することにより、リボコルチンIタンパク質全長をコードするものであることを確認した。取得したクローニングをpCD11p01と名づけた。（特開平5-15380号公報）。そしてこのヒトリボルコルチンI遺伝子（cDNA）を含むベクターpCD11p01を制限酵素Xmn IおよびBamHIで消化した後、フェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製した。さらにアガロースゲル電気泳動後、ガラスビーズ法によって約13000塩基対に相当するDNAを精製した。

【0034】該DNAをライゲーションした後、これを大腸菌DH5株（東洋紡（株）製）に導入して形質転換した。得られた形質転換体よりベクターを調製し、目的とするベクターpRL2L（图5）を持った形質転換体をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0035】このリボコルチンI発現ベクターpRL2Lを制限酵素Eco RIおよびHind IIIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約5000塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。これとは別に、公知のプラスミドpUC19を制限酵素Eco RIおよびHind IIIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約6000塩基対に相当するバンドを切り出し、ゲルから抽出精製した。

【0036】これら両者の断片をライゲーションの後、大腸菌DH5株を形質転換して目的とするベクターpRL2M（图6）をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0037】【ベクターpTL2Mの作製】上記pRL2Mを錠型とし、オリゴデオキシリボヌクレオチド5'-TTGACTAGTAAATAATAGTA-3'およびオリゴデオキシリボヌクレオチド5'-CTAGAAATT/CATGTTGAAAAGTGTCTTATC-3'を合成プライマーとして、Taqポリメラーゼを用いたPCRによって目的断片を増幅した。制限酵素Sph IおよびEco RIで末端調節し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約6000塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。

【0038】一方、これとは別に、pRL2Mを制限酵素Sph IおよびEco RIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約45000塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。これら両者の断片をライゲーシ

ヨンの後、大腸菌DH5株を形質転換して目的とするベクターpTL2M(図7)をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0039】このようにして作製したpTL2Mを制限酵素AfaI I I I およびHind I I I Iで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0040】そして上記挿入断片との発現ベクターpTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計2本を、DNAライゲーションキット(宝酒造(株)製)を用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株(東洋筋(株)製)に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmaを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmaを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号1の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0041】【実施例2】配列番号2の改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓cDNAライブリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを鉄型として、配列番号1.2および1.4の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびHind I I I によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約5500塩基対に相当するバンドを切り出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片1とした。

【0042】一方、これとは別に、同じcDNAを鉄型として、配列番号1.5および1.3の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、制限酵素Hind I I I によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約13500塩基対に相当するバンドを切り出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片2とした。

【0043】さらにこれとは別に、実施例1の場合と同じにして作製したシソサッカロミセス・ボンベ発現ベクターpTL2Mを用意し、このベクターpTL2Mを制限酵素AfaI I I I およびHind I I I Iで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0044】そして上記挿入断片2本とこの発現ベクター-pTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計3本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmbを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmbを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号2の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0045】【実施例3】配列番号3の改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓cDNAライブリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを鉄型として、配列番号1.2および1.6の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびEcoRI(宝酒造(株)製)によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約11000塩基対に相当するバンドを切り出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片1とした。

【0046】一方、これとは別に、同じcDNAを鉄型として、配列番号1.7および1.3の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素EcoRIおよびHind I I I によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約7000塩基対に相当するバンドを切り出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片2とした。

【0047】さらにこれとは別に、実施例1の場合と同じにして作製したシソサッカロミセス・ボンベ発現ベクター-pTL2Mを用意し、このベクター-pTL2Mを制限酵素AfaI I I I およびHind I I I Iで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0048】そして上記挿入断片2本とこの発現ベクター-pTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計3本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmcを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmcを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号3の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0049】【実施例4】配列番号4の改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓cDNAライブリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを鉄型として、配列番号1.2および1.8の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびAfaI I I I によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約18000塩基対に相当するバンドを切り出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片とした。

【0050】一方、これとは別に、実施例1の場合と同じにして作製したシソサッカロミセス・ボンベ発現ベクター-pTL2Mを用意し、このベクター-pTL2Mを制限酵素AfaI I I I およびHind I I I Iで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0051】そして上記挿入断片との発現ベクター-pTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計2本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した

後、目的のプラスミド $p\text{Tl2BmD}$ を得た。アルカリ-SDS 法に従って $p\text{Tl2BmD}$ を大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号 4 の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0052】【実施例 5】配列番号 5 の変改ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓 cDNA ライブラリーより $pUC19$ 上にクローニングしたヒト血清アルブミン cDNA を鉢型として、配列番号 1 および 14 の塩基配列で表されるプライマーを用いて PCR 増幅を行ない、次いで制限酵素 $NcoI$ および $HindIII$ によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約 500 塩基に相当するバンドを切り出し、DNA-PRP を用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片 1 とした。

【0053】これとは別に、同じ cDNA を鉢型として、配列番号 1 および 16 の塩基配列で表されるプライマーを用いて PCR 増幅を行ない、次いで制限酵素 $HindIII$ および $EcoRI$ によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約 700 塩基に相当するバンドを切り出し、DNA-PRP を用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片 2 とした。

【0054】またこれとは別に、同じ cDNA を鉢型として、配列番号 17 および 18 の塩基配列で表されるプライマーを用いて PCR 增幅を行ない、次いで制限酵素 $EcoRI$ および $AfaIII$ によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約 700 塩基に相当するバンドを切り出し、DNA-PRP を用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片 3 とした。

【0055】さらにこれとは別に、実施例 1 の場合と同様にして作製したシソサッカロミセス・ボンベ発現ベクター $p\text{Tl2M}$ を用いし、このベクター $p\text{Tl2M}$ を制限酵素 $AfaIII$ および $HindIII$ で二重消化し、約 5000 塩基に相当するバンドを切出した。

【0056】そして上記挿入断片とこの $p\text{Tl2M}$ の上記制限酵素による二重消化物との計 4 本を、DNA ライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌 DH5 株に導入して形質転換した後、目的のプラスミド $p\text{Tl2BmD}$ を得た。アルカリ-SDS 法に従って $p\text{Tl2BmD}$ を大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号 5 の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0057】【実施例 6】癌転移阻害ペプチドをコードする配列番号 7 の塩基配列で表される遺伝子の作製。配列番号 6 のアミノ酸配列をもとに、シソサッカロミセス・ボンベのコドン使用頻度 (Nasim, A. et al: *Molecular Biology of the Fission Yeast*, Academic Press, 1989, p263.) に合せて、配列番号 10 および 11 の塩

基配列で表される 2 本の一本鎖オリゴ DNA を、DNA 自動合成装置 (Applied Biosystems) を用いて合成した。なお、配列番号 10 の塩基配列は、5' 末端に制限酵素 $BamHI$ への挿入部位と開始コドン ATG を、3' 末端に終始コドン TAA と制限酵素 $HindIII$ への挿入部位を導入した遺伝子のセンス鎖であり、配列番号 11 の塩基配列はそのアンチセンス鎖である。脱保護、精製後、これら 2 本を 70°C でアニーリングした。

【0058】一方、これとは別にプラスミド $pUC19$ を、制限酵素 $BamHI$ (宝酒造(株)製) および $HindIII$ で二重消化し、フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約 2600 塩基に相当するバンドを切り出し、DNA-PRP を用いたガラスビーズ法で精製した。

【0059】これら両者の断片を、DNA ライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌 $M109$ 株 (宝酒造(株)製) に導入して形質転換した後、アンビシジョン耐性を持ち、かつ $XbaI$ プレート上で白コロニーを提示するポジティブクローンをスクリーニングし、目的のプラスミド $p\text{I2A}$ を得た。アルカリ-SDS 法に従って $p\text{I2A}$ を大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、目的の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0060】【実施例 7】癌転移阻害ペプチド遺伝子を含有する発現ベクター $p\text{Tl2BmI}$ の作製

プラスミド $p\text{I2A}$ を制限酵素 $NcoI$ および $HindIII$ で二重消化で末端を調節し、アクリルアミドゲル電気泳動により約 70 塩基に相当するバンドを切り出し、ゲルから溶出して癌転移阻害ペプチド遺伝子挿入断片とした。

【0061】この遺伝子断片と実施例 4 で作製した $p\text{Tl2BmD}$ の制限酵素 $AfaIII$ 消化物 (部分消化後、約 7000 塩基に相当するバンドを DNA-PRP を用いて精製) との計 2 本を、DNA ライゲーションキットを用いて、ライゲーションした。大腸菌 DH5 株に形質転換した後、第 1 図に示す、目的のプラスミド $p\text{Tl2BmI}$ を得た。アルカリ-SDS 法に従って $p\text{Tl2BmI}$ を大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号 7 の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0062】【実施例 8】発現ベクター $p\text{Tl2BmI}$ を用いたシソサッカロミセス・ボンベの形質転換シソサッカロミセス・ボンベのロイシン要求性株、 $h-leu1-3-2$ (ATCC 38399) をロイシン含有最少培地 $M - leu1-3-2$ 10¹ 細胞数/m¹ になるまで生育させた。速集菌、水による洗浄後 10¹ 細胞数/m¹ になるように 100 mM 脱酸リチウム (pH 5.0) に懸滴し、30°C で 60 分間インキュベートした。

その後、上記懸濁液 $1000 \mu\text{l}$ に、制限酵素 PstI で消化した pAL7 (K. Okazaki et al.: *Nucl. Acids Res.* 18, 6485-6489 (1990)) $1 \mu\text{g}$ および $2 \mu\text{g}$ の発現ベクター pTL2BmI を $10 \mu\text{l}$ の $\text{T}E$ バッファーに溶かした溶液を加え、 50% $\text{PEG}4000$ を $290 \mu\text{l}$ 加えてよく混合した後、 30°C で 60 分間、 43°C で 15 分間、室温で 10 分間の順にインキュベートした。遠心分離により $\text{PEG}4000$ を除去し、 1ml の培養液 $1/2 \text{YEL-L-} \text{Leu}$ に懸濁した。

【0063】この懸濁液から $1000 \mu\text{l}$ を分取し、さらに $9000 \mu\text{l}$ の培養液 $1/2 \text{YEL-L-} \text{Leu}$ で希釈して、 32°C 30 分間インキュベートした後、 $300 \mu\text{l}$ を最少寒天培地 MMA にスプレッドした。 32°C で 3 日間インキュベートし、得られた形質転換体を G418 を $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む YEA 培地に移し、さらに 32°C で 5 日間培養し、得られたクローンを目的とする各形質転換体とした。

【0064】一方、これとは別に、癌転移阻害ペプチド遺伝子を持たないプラスミド pTL2M (既述) および pTL2Bm (特願平5-249310号明細書) についても、同じ方法で形質転換体を作製し、ネガティブコントロールとした。なお、プラスミド pTL2Bm は以下のようにして作製した。

【0065】【プラスミド pTL2Bm の作製】国立予防衛生研究所遺伝子バンクより供与を受けた、ヒト血清アルブミン cDNA を含むベクター pILM1B5 を鉢型とし、オリゴデオキシリボヌクレオチド 5'-AGACCA TGGATGCACACACAGAGTGAGGT-3' およびオリゴデオキシリボヌクレオチド 5'-CAGGAAACAGCTATGACCAT-3' を合成プライマーとして、 Taq ポリメラーゼを用いた PCR によって目的断片を増幅した。制限酵素 NcoI および HindIII で末端調節し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースグレル電気泳動により約 1800 基基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。

【0066】これとは別に、 pTL2M を制限酵素 AfaIII および HindIII で消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースグレル電気泳動により約 5000 基基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。

【0067】これら両者の断片をライゲーションの後、大腸菌 $\text{DH5}\alpha$ 株を形質転換して目的とするベクター pTL2Bm (図 8) をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0068】【実施例 9】形質転換体の培養および無細胞抽出液の調製
抗生物質 G418 (GIBCO BRL) を $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含む 50ml の YPD 培地 [(2% グルコース (和光純薬 (株) 製)、1% バクターストエキス (Di

eco) 、2% バクターベプトン (Difco)] に、実施例 8 で作製した形質転換体を植菌し、 32°C で 5 日間培養した。その培養液から 10° 個の菌体を集菌し、洗菌後、 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で懸濁し、超音波破碎を行った。終濃度が 1% になるように 10% SDS 溶液を加え、 80°C で 15 分間加熱した。遠心分離によって無細胞抽出液 (上清) を得た。

【0069】これとは別に、癌転移阻害ペプチド遺伝子を持たない上記 pTL2M および pTL2Bm を導入した形質転換体についても、同様の方法で無細胞抽出液を作製し、ネガティブコントロールとした。

【0070】【実施例 10】 SDS-PAGE による癌転移阻害融合タンパク質の発現解析

SDS-PAGE によって、実施例 9 で作製した各形質転換体由来の無細胞抽出液について発現解析を行なった。結果を図 2 に示す。同図から明らかなように、 pTL2mB1 による形質転換体では、コントロールである pTL2BmI による形質転換体に比較して、分子量 $69,000$ のバンド (同図中、* で示す) が、癌転移阻害融合タンパク質を產生していることによって、分子量 $71,000$ の位置 (同図中、** で示す) に移動していることが検出できた。デシントメータによって測定したところ、癌転移阻害融合タンパク質の產生量は、全菌体タンパク質の 3.0% 程度であった。

【0071】【実施例 11】ウエスタンブロッティングによる癌転移阻害融合タンパク質の確認

実施例 9 で作製した各形質転換体由来の無細胞抽出液について実施例 10 と同様にして SDS-PAGE を行なった。得られたゲルを PVDF 膜 (Bio-Rad) に転写し、癌転移阻害ペプチドに特異的な抗体 (A. Iosoi et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 7-14 (1993)) を用いてウエスタンブロッティングを行い、 ECL (アマシマム (株) 製) によって検出した。結果を図 3 に示す。同図から明らかなように、該融合タンパク質を含む配列に相当する分子量 $71,000$ 附近の位置に唯一の明瞭なバンドが得られることから、該融合タンパク質に特異的なアミノ酸配列が含まれている融合タンパク質が產生していることが確認された。

【0072】【実施例 12】癌転移阻害融合タンパク質の精製

pTL2BmI により形質転換された形質転換体を、 G418 を $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含む 50ml の YPD 培地で 32°C 、1 日間前培養した後、 G418 を $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む 1 リットルの YPD 培地に $1 \times 10^\circ$ / ml の割合で植菌してさらに 4 日間培養した。集菌後の菌体の 4 倍量の 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)

5) [$12 \mu\text{M}$ の APMSF (和光純薬 (株) 製)、 $2 \mu\text{M}$ ロイペプチド (和光純薬 (株) 製)、 2mM の DTA を含む] に懸濁し等量のガラスビーズ (ビードビ

ーター) を用いて 0℃で破碎した。12,000 rpm で 20 分間遠心分離した沈澱を同じ緩衝液で洗浄した後、6Mグアニジン塩酸と 10 mMのジチオスレイトールを含んだ 50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) にて 50℃ 1 時間で可溶化した後、12,000 rpm、20 分間遠心分離した上清を 0.1 MN a C1、1 mM EDTA、2 mM 遺伝子型グルタチオン、0.2 mM 脂肪酸型グルタチオンを含んだ 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で 100 倍 (v/v) に 4℃で徐々に希釈した。1 晩 4℃で放置後、限外濾過膜 (アミコン) にて濃縮しスバーロース 12 カラムにてゲル通過し、各画分について SDS-PAGE にて解析し分子量 71,000 の位置に唯一のバンドが見られた画分を集め精製癌細胞融合タンパク質とした。

【0073】【実施例 13】精製癌細胞融合タンパク質の癌細胞浸潤阻害活性の測定

実施例 12 で精製した癌細胞融合タンパク質について、癌細胞の浸潤抑制効果を調べた。評価方法は Albini らの方法 (Albini et al.: Cancer Res. 47, 3239-3245 (1987)) に従って行った。8 μm のポアサイズを持つポリカーボネートフィルターにより、上層と下層に分けられたケモキシセル (コラボウ (株) 製) のフィルター上面に 10 μg のマトリゲル (コラボレーティブ (株) 製) を塗布し、室温で一晩乾燥させた。使用直前に培養液で膨潤させ、24穴のカルチャーブレートにセットした。癌細胞は B16 メラノマ由来の高転移性ケローン B16 F6 7 を使用した。

【0074】細胞を 1.85 kBq/m1 の [¹²⁵I] IUDR (アマシャム (株) 製) 存在下で 2 日間培養した。使用直前にトリプシン溶液で細胞を回収した後、0.1% の牛血清アルブミンを含む培養液に懸滴し細胞数と、取り込まれた [¹²⁵I] IUDR の放射能を計測

した。ケモキシセルの下層には 20 μg/m1 のヒトタイプ I ネクチンを入れ、上層には 5 × 10⁴ 個の細胞を種々の濃度の癌細胞融合タンパク質と共に入れ、炭酸ガスインキュベーター中で 20 時間培養した。

【0075】培養終了後、フィルターの上面に残っている細胞を綿棒でかきとり、フィルターをティッシュソルビライザー (アマシャム (株) 製) で下面に移動した細胞と含みに溶解した後、放射能を計測した。結果を図 4 に示す。同図から明らかなように、本癌細胞融合タンパク質により、癌細胞の浸潤が有意に阻害されたことが示された。

【0076】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明による癌細胞浸潤阻害活性の測定

【0077】

【配列リスト】

配列番号: 1

配列の長さ: 1763

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

30 存在位置: 3..1763

特徴を決定した方法: E

配列

CC ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG CGA	50
GAA GAA ATT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT	98
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTC AAA TTA GTG ATT GAA GTA ACT	146
GAA TTT GCA AAA GCA ATT GTC GCT GAT GAG TCA GCT GAA ATT TGT GAC	194
AAA TCA CTT CAT ACC CTT ATT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT	242
CTT CGT GAA ACC ATT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA	290
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	338
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	386
CAT GAC ATT GAA GAG ACA ATT TTG AAA AAA TAC TTA ATT GAA ATT GCC	434
AGA AGA CAT CCT TAC ATT TAT GGC CGG GAA CTC CTT TTC ATT GCT AAA	482
AGG TAT AAA GCT GCT ATT ACA GAA ATT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	530
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA ATT CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT	578
TGG TCT GCC AAA CAG AGC CTC AAA ATT GTC GCT GCT CAA AAA ATT GGA	626
GAA AGA GCT TTC AAA GCA ATT GTC GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA ATT	674
CCC AAA GCT GAG ATT GCA GAA ATT GTT TCC AAG ATT GTG ACA GAT ATT ACC	722
AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG ATT GAA ATT GTC GAT	770
GAC AGG GCG GAC ATT GCC AAG ATT ATC ATT GAA ATT CAG GAT TCG ATC	818

17

18

TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC	866
CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT	914
TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT	962
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTG CTC GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA	1010
AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG	1058
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAA AAG TGC TGT GGC GCT GCA GAT CCT CAT	1106
GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG	1154
CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA	1202
GAG TAC AAA TTC CAG AAA CGG CTA TTA GTT CTC TAC ACC AAG AAA GTC	1250
CCC CAA GTG TCA ACT CCA CCT CTT GTC GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA	1298
AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC	1346
TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG	1394
CAT GAG AAA ACC CCA GTC AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG	1442
TCC TTG GTG AAC AGC CGG CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA	1490
ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA	1538
GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT	1586
GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAC AAA CAC AGC ACC GCA ACA AAA GAG CAA	1634
CTG AAA CCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTC GAG AAG TGC TGC	1682
AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCG GAG GAG GGT AAA AAA CCT	1730
GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA	1763

配列番号: 2

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の長さ: 1761

配列の特徴

配列の型: 核酸

特徴を表す記号: CDS

鎖の数: 二本鎖

存在位置: 1.. 1761

トポロジー: 直鎖状

特徴を決定した方法: E

配列

ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA	48
GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT	96
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTC AAA TTA GTG ATG GAA GTC ACT	144
GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTC GCT GAT GAG TCA GCT GAA ATT TGT GAC	192
AAA TCA CCT CAT ACC CCT TTT GGA GAA AAA TTA TGC ACA ATT GCA ACT	240
CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA	288
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	336
CTC CCC CGA TTG GTG AGC CCA GAG GTC ATT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	384
CAT GAC ATT GAA GAC ATT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC	432
AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CCT TTG TTT GCT AAA	480
AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	528
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CCT GAT GAA CCT CGG GAT GAA GGG AAG GCT	576
TGG TCT GGC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GGC AGT CTC CAA AAA TTT GGA	624
GAA AGA GCT TTC AAA GCA TTG GCA GTC GCT CGC CTG AGC CAG AGA ATT	672
CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA TTG ACA GAT CCT ACC	720
AAA GTC CAC ACC GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TTG GCT GAT	768
GAC AGG GCG GAC CCT GCC AAG GAT ATT ATC TTG GAA ATT CAG GAT TGC ATC	816
TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC	864
CAC TGC ATT GCC GAA TTG GAA ATT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT	912
TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT	960
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TCT CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA	1008
AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CCT GCC AAG	1056
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GGC GCT GCA GAT CCT CAT	1104
GAA TGC ATT GGC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT TTG GAA GAG	1152

19

20

CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA	1200
GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA	1248
CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA	1296
AAA GTG GCC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC	1344
TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG	1392
CAT GAG AAA ACC CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG	1440
TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA	1488
ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT ATT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA	1536
GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAC GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT	1584
GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA CAA AGC CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA	1632
CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAC TGC TGC	1680
AAG GCT GAC GAT AAC GAG ACC TGC TTT GGC GAG GAG GGT AAA AAA CTT	1728
GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA	1761

配列番号：3

配列の長さ：1761

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..1761

特徴を決定した方法：E

配列

ATG GAT GCA CAC AAC AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA	48
GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT	96
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT	144
GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTA GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC	192
AAA TCA CTT CAT ACC CCT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA ATA GTT GCA ACT	240
CTT GGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA	288
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TGC CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	336
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	384
CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC	432
AGA AGA-CAT CCT TAC TTT TAT GGC CCG GAA CTC CCT TTG TTT GCT AAA	480
AGG ATT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	528
GCC TGC CTG TTG CCA AAC CTC GAT GAA CCT CGG GAT GAA GGG AAC GCT	576
TCG TCT GGC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA	624
GAA AGA GCT TIC AAA GCA TGC GCA GTG GCT GCG CTC AGC CAG AGA TTT	672
CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GAT TTG TCC AAC ATA GTG ACA GAT CCT ACC	720
AAA GTC CAC AGG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTC CCT GAA TGT GCT GAT	768
GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAC AGT TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC	816
TCC AGT AAA CTG AGA GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTC TTG GAA AAA TCC	864
CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT	912
TCA TTA GCT GAT GAT TTT GGT GAA AGT GAG GAT GAT TTG AAA AAC TAT	960
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTC GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA	1008
AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CCT GCC AGG	1056
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAC TGC TGT GCA GCT GCA GAT CCT CAT	1104
GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTC AAA CCT CCT TTG GAA GAG	1152
CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TAC GTC GAT CCT TTT AAG GAG CCT GGA	1200
GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA	1248
CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CCT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA	1296
AAA GTG GCC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC	1344
TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG	1392
CAT GAG AAA ACC CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG	1440
TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA	1488

21

22

ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA 1536
 GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT 1584
 GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA 1632
 CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC 1680
 AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT 1728
 GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA 1761

配列番号：4

配列の長さ：1765

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

*配列の種類：c DNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

10 存在位置：1.. 1758

* 特徴を決定した方法：E

配列

ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA 48
 GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT 96
 CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTC AAA TTA GTG AAT GAA GTC ACT 144
 GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTC GCT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC 192
 AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT 240
 CCT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA 288
 CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC 336
 CTC CGC CGA TTG GTG AGA CGA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT 384
 CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC 432
 AGA AGA CAT TAC TTT TAT GCC CGG GAA CTC CTT TTG TTT GCT AAA 480
 AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT 528
 GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CCT CGG GAT GAA GGG AGG GCT 576
 TGG TCT GCG AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCG AGT CTC CAA AAA TTT GGA 624
 GAA AGA GCT TIC AAA GCA TGG GCA TTG GTG GCG CTC AGC CAG AGA TTT 672
 CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC 720
 AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT 768
 GAC AGG CGG GAC CTC GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC 816
 TCC AGT AAA CTG AGA GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC 864
 CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA ATT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT 912
 TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT 960
 GCT GAG GCA AAG GAT GTC TCT CTG GCC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA 1008
 AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG 1056
 ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGT TGT GGC GCT GCA GAT CCT CAT 1104
 GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG 1152
 CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA 1200
 GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT GCT TAC ACC AAG AAA GTA 1248
 CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTC GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA 1296
 AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC 1344
 TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG 1392
 CAT GAG AAA ACG CCA GTC AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG 1440
 TCC TTG GTG AAC AGG CGA CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA 1488
 ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT ATT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA 1536
 GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT 1584
 GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA AAC CAA GCG GCA ACA AAA GAG CAA 1632
 CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTC GAG AAG TGC TGC 1680
 AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT 1728
 GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAC ATG T 1765

配列番号：5

50 配列の長さ：1767

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c DNA to mRNA

配列

CC ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA 50
 GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT 98
 CAG CAG TGT CCA TAA GAA GAT CAT GTT AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT 146
 GAA TTT GCA AAA ACA TGT GAA CCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC 194
 AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT 242
 CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA 290
 CCT GAG AGA AAA GAT GAA TGC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC 338
 CTC CCC CGA TTG GTG GAA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT 386
 CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC 434
 AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA 482
 AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA CCT GCT GAT AAA GCT 530
 GCC TGC CTC TTG CCA AAG CTT GAT GAA CCT CGG GAT GAA GGG AAG GCT 578
 AGC TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA 626
 GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT 674
 CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC 722
 AAA GTC CAC AGC GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTC CTT GAA TGT GCT GAT 770
 GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC 818
 TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC 866
 CAC TGC ATT GGC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT 914
 TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AGG GAT GAT TGC AAA AAC TAT 962
 GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA 1010
 AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG 1058
 ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT 1106
 GAA TGC ATT GGC AAA GTG TTC GAT GAA TTC AAA CCT CTT TTG GAA GAG 1154
 CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CCT TTT AAC CAG CCT GGA 1202
 GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT GCT TAC ACC AAG AAA GTA 1250
 CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CCT GTAA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA 1298
 AAA GTG GCG AGC AAA TGT TGT AAA CCT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC 1346
 TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TIA TGT GTG TTG 1394
 CAT GAG AAA ACG CCA TGA ACT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG 1442
 TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA 1490
 ACA TAC TGT CCC AAA GAG TTT ATT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA 1538
 GAT ATA TGC ACA CCT TCT GAG AAG GAG CAA ATA AAG AAA CAA ACT 1586
 GCA CCT TTG GAG CTC GTG AAA CAA AAC CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA 1634
 CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTC GAG AAG TGC TGC 1682
 AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CCT 1730
 GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAC ATG T 1767

配列番号：6

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

配列

Ala Glu Asp Gly Asp Ala Lys Thr Asp Glu Lys Ala Glu Gly

1 5 10 15

Ala Glu Asp Ala Lys

20 21

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列番号: 7

* 鎮の数: 二本鎖

配列の長さ: 71

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

* 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

CC ATG GCC GAG GAC GGT GAC GCC AAG ACC GAC CAA GCT GAG AAG GCT GAG 50
GGT GCC GGT GAC GCC AAG TAA 71

配列番号: 8

トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 609

配列の種類: プロテイン

配列の型: アミノ酸

配列

Met	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly
1								10						15	
Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu
					20			25					30		
Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr
					35			40				45			
Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp
					50			55			60				
Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr
					65			70			75		80		
Leu	Arg	Glu	Glu	Thr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu
					85			90			95				
Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn
					100			105			110				
Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe
					115			120			125				
His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala
					130			135			140				
Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys
					145			150			155		160		
Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala
					165			170			175				
Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala
					180			185			190				
Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly
					195			200			205				
Gln	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe
					210			215			220				
Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr
					225			230			235		240		
Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp
					245			250			255				
Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile
					260			265			270				
Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser
					275			280			285				
His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro
					290			295			300				
Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr
					305			310			315		320		

27

Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala
 325 330 335
 Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys
 340 345 350
 Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His
 355 360 365
 Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu
 370 375 380
 Pro Glu Asn Leu Ile Lys Glu Asn Cys Glu Leu Phe Lys Glu Leu Gly
 385 390 395 400
 Glu Tyr Lys Phe Glu Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
 405 410 415
 Pro Glu Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly
 420 425 430
 Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro
 435 440 445
 Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Glu Leu Cys Val Leu
 450 455 460
 His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu
 465 470 475 480
 Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu
 485 490 495
 Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala
 500 505 510
 Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Glu Ile Lys Lys Glu Thr
 515 520 525
 Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Glu
 530 535 540
 Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys
 545 550 555 560
 Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu
 565 570 575
 Val Ala Ala Ser Glu Ala Ala Leu Gly Leu Tyr Met Ala Glu Asp Gly
 580 585 590
 Asp Ala Lys Thr Asp Glu Ala Glu Lys Ala Glu Gly Ala Gly Asp Ala
 595 600 605
 Lys
 609

配列番号：9

配列の種類：c DNA to mRNA

配列の長さ：1832

40 配列の特徴

配列の型：核酸

特徴を表す記号：CDS

鎖の数：二本鎖

存在位置：3..1832

トポロジー：直鎖状

特徴を決定した方法：E

配列

CC ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA 50
 GAA GAA ATT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT 98
 CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTC AAA TTA GTG ATT GAA GTA ACT 146
 GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTC GAT GAG TCA GCT GAA ATT TGT GAC 194
 AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT 242
 CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA 290

29

CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC 338
 CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT 386
 CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC 434
 AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA 482
 AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT 530
 GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CCG GAT GAA GGG AAG GCT 578
 TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA 626
 GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT 674
 CCC AAA GCT GAC TTT GCA GAA GTT TCC AAC TTA GTG ACA GAT CTT ACC 722
 AAA GTC CAC AGC GAA TGC CTC GAT GGA GAT CTC CTT GAA TGT GCT GAT 770
 GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAC TAT ATC TGT GAA ATT CAG GAT TCG ATC 818
 TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC 866
 CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA ATT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TGC CCT 914
 TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AGG GAT GTT TGC AAA AAC TAT 962
 GCT GAG GCA AAC GAT GTC TTC CTC GCC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA 1010
 AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG 1058
 ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAC AGG TGC TGT GCG GCT GCA GAT CCT CAT 1106
 GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG 1154
 CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAC CAG CTT GGA 1202
 GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA 1250
 CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTC GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA 1298
 AAA GTG GCG AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC 1346
 TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTC GTC CTC AAC CAG TTA TGT GTG TTG 1394
 CAT GAG AAA AGC CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG 1442
 TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTC GAA GTC GAT GAA 1490
 ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT ATT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA 1538
 GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AGG AGA CAA ATC AGG AAA CAA ACT 1586
 GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA AAC CAC AAC CCC AAC GCA ACA AAA GAG CAA 1634
 CTG AAA GCT GTT ATT GAT GAT TAC GCA GCT TTT GTC GAG AGG TGC TGC 1682
 AAG GCT GAC GAT AGG GAG ACC TGC TTT GCG GAG GAG GGT AAA AAA CCT 1730
 GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCG TTA GGC TTA TAC ATG GGC GAG GAC GGT 1778
 GAC GGC AAC GAC CAA GCT GAG AAC GCT GAG GGT GCG GGT GAC GGC 1826
 AAG TAA 1832

30

配列番号：1 0

配列の長さ：7 3

配列の型：核酸

* 鎮の数：一本鎮

トポロジー：直鎮状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCC ATG GCC GAG GAC GGT GAC GGC AAC ACC GAC CAA GCT GAG AAC GCT 50
 GAG GGT GGC GGT GAC GGC AAC TA 73

40*トポロジー：直鎮状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：Ye s

※

配列

AGCTTA CTT GGC GTC ACC GGC ACC CTC AGC CTT CTC AGC TTG GTG GTC GGT CTT 51
 GGC GTC ACC GTC CTC GGC CAT G 73

鎮の数：一本鎮

トポロジー：直鎮状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

31

32

28

AGACCATGGG TGCACACAAG AGTGAGGT

配列番号：1 3

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

配列

ATAAACCTTT TGATCTTCAT

配列番号：1 4

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

配列

AGCAAGCTTT GGCACACAGGC

配列番号：1 5

配列の長さ：2 9

配列の型：核酸

配列

AGCAAGCTTG ATGAACTTCG GGATGAAAG

配列番号：1 6

配列の長さ：2 4

配列の型：核酸

配列

AGCGAATTCA TCGAACACTT TGCG

配列番号：1 7

配列の長さ：2 9

配列の型：核酸

配列

AGCGAATTCA AACCTCTTGT GGAAGAGCC

配列番号：1 8

配列の長さ：4 0

配列の型：核酸

配列

AAGAAGCTTG AATTCACTATG TATAAGCTTA AGGCAGCTTG

40

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

29

24

29

40

る。

【図5】発現ベクターpRL2Lの構成図である。

【図6】発現ベクターpRL2Mの構成図である。

【図7】発現ベクターpTL2Mの構成図である。

【図8】発現ベクターpTL2Bmの構成図である。

【図面の簡単な説明】

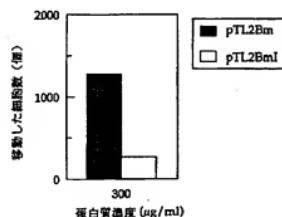
【図1】発現ベクターpTL2Bmの構成図である。

【図2】SDS-PAGE観察図である。

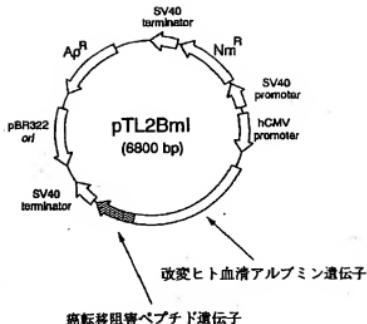
【図3】ウエスタンプロット観察図である。

【図4】癌細胞浸潤阻害活性測定結果を示すグラフである。

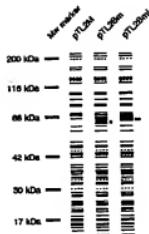
【図4】



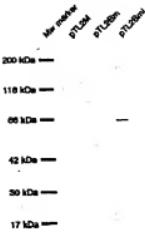
【図1】



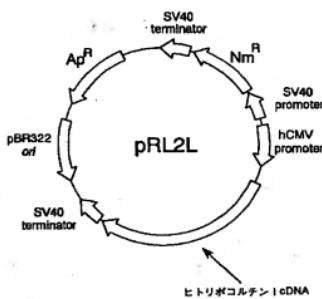
【図2】



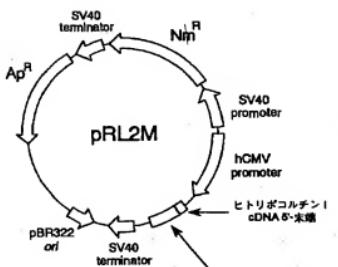
【図3】



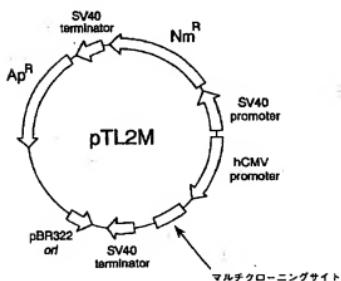
【図5】



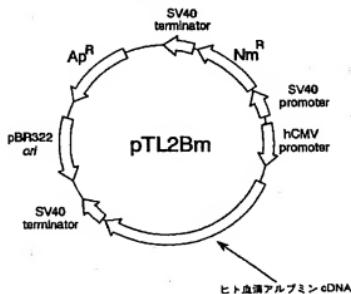
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶ 譲別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
(C 1 2 N 1/19
C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:645)

(72)発明者 塚本 洋子
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内

(72)発明者 磯合 敦
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内
(72)発明者 熊谷 博道
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内